

Aus dem Departement für Nutztiere der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
(Direktor Prof. Dr. Dr. h. c. U. Braun)

**Untersuchung von BSE-Nachkommen
auf Protease-resistentes Prion Protein im Blut**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Andreas Christian Tschuor

Tierarzt

von Trun GR

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. Dr. h. c. U. Braun, Referent

Prof. Dr. F. Ehrensperger, Korreferent

Zürich, 2007

Zentralstelle der Studentenschaft

Meinen lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. SUMMARY	2
3. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	3
4. LITERATURÜBERSICHT	5
4.1. BSE	5
4.1.1. Definition	5
4.1.2. Das natürliche Prion Protein	5
4.1.3. Das Prion Protein Scrapie (PrP ^{Sc}) als BSE-Erreger	5
4.1.4. Spongiforme Enzephalopathien bei anderen Tierarten	6
4.2. Maternale Transmission von BSE	7
4.2.1. Mögliche Wege der maternalen Transmission von BSE	7
4.2.1.1. Pränatale Übertragung	7
4.2.1.2. Perinatale Übertragung	7
4.2.1.3. Laktogene Übertragung	7
4.2.2. Maternale Transmission bei anderen TSE's von Tieren	8
4.2.3. Erste Vermutung einer maternalen Transmission von BSE	8
4.2.4. Erster Fall einer maternalen Transmission von BSE	9
4.2.5. Maternale Transmission bei BSE-Nachkommen in England	9
4.2.5.1. Möglicher genetischer Einfluss auf die BSE-Erkrankung	10
4.2.5.2. Einfluss des Geburtszeitpunktes in der Inkubationszeit	10
4.2.6. BSE-Nachkommen in der Schweiz	11
4.3. Genetisch bedingte Empfänglichkeit für BSE	12
4.3.1. Genetische, rassenunabhängige Prädisposition für BSE	12
4.3.2. Rassenbedingte Prädisposition für BSE	12
4.3.3. Genetisch bedingte Empfänglichkeit für TSE's bei Tieren	13
4.4. Infektiosität von Spermien, Eizellen und Embryonen	13
4.4.1. Nachkommen von an BSE erkrankten Stieren	13
4.4.2. Embryonen aus an BSE erkrankten Elterntieren	14
4.5. Übertragung von BSE mittels Produkten tierischer Herkunft	15
4.6. Iatrogene Übertragungswege von BSE	15

4.7. Übertragbarkeit von BSE auf den Menschen	15
4.8. BSE-Labordiagnostik	16
4.8.1. Einleitung	16
4.8.2. Neurohistologie als Gold-Standard	16
4.8.3. In der Schweiz zugelassene BSE-Tests	17
4.8.3.1. Der Prionics®-Check WESTERN	17
4.8.4. Diagnostik am lebenden Tier	18
5. MATERIAL UND METHODIK	19
5.1. Tiergruppe A: BSE-Nachkommen	19
5.1.1. Aufarbeitung von Daten der Muttertiere und der Nachkommen	19
5.1.2. Geschwisterverhältnisse unter den 181 BSE-Nachkommen	21
5.1.3. Rassenverteilung	22
5.2. Tiergruppe B: Gesunde Kontrollpopulation	23
5.3. Untersuchung der Blutproben auf Protease-resistentes Prion Protein	24
5.4. Statistik	26
5.5. Zusammenarbeit mit anderen Institutionen	26
6. ERGEBNISSE	27
6.1. BSE-Nachkommen (Tiergruppe A)	27
6.1.1. An BSE erkrankte Muttertiere der BSE-Nachkommen	27
6.1.2. BSE-Nachkommen	27
6.1.2.1. Beziehung zwischen klinischen Parametern und einem positiven Testresultat	27
6.1.2.2. Zeitdifferenz von der Geburt der BSE-Nachkommen zum Diagnosedatum BSE beim Muttertier	28
6.1.2.3. Rassenverteilung der BSE-Nachkommen mit PrP ^{res} im Blut	30
6.2. Vergleichsgruppe (Tiergruppe B)	30
6.2.1. Zeitdifferenz zwischen der Geburt des Nachkommens und dem Testdatum beim Muttertier	30
6.3. Vergleich der positiven Blutbefunde der beiden Nachkommengruppen A und B	31

7. DISKUSSION	32
7.1. Vergleichbarkeit der Tiergruppen A und B	32
7.2. Maternale Übertragung	32
7.2.1. Vergleich der Resultate mit der MAFF-Studie	32
7.2.2. Zeitabstand von der Geburt der PrP ^{res} -positiven Nachkommen zum Diagnosedatum beim Muttertier	33
7.2.3. Transplazentare Übertragung	34
7.2.4. Laktogene Übertragung	34
7.3. Der Bluttest der Alicon AG	35
7.3.1. Vergleich der Prionics-Resultate und der klinischen Befunde der auf PrP ^{res} positiv getesteten BSE-Nachkommen	36
7.3.2. Tiere der Gruppe B mit einem positiven Nachweis von PrP ^{res}	36
7.4. Genetisch bedingte Empfänglichkeit für BSE	37
7.4.1. Genetische Prädisposition	37
7.4.2. Rassenbedingte Prädisposition	38
7.5 Schlussbemerkung	38
8. LITERATURVERZEICHNIS	40
9. LEBENSLAUF	47
10. DANKSAGUNG	48

1. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, ob im Blut von schweizerischen BSE-Nachkommen Protease-resistentes Prion Protein (PrP^{res}) vorkommt. Die Häufigkeit des Nachweises von PrP^{res} in dieser Tiergruppe wurde der Nachweishäufigkeit in einer Vergleichsgruppe gegenüber gestellt.

Die Untersuchung wurde an 181 BSE-Nachkommen und 134 gesunden Vergleichstieren inklusive deren 106 Muttertiere durchgeführt. Die Blutproben wurden mit Hilfe eines für den Nachweis von PrP^{res} entwickelten Tests (Alicon PrioTrap[®]) untersucht. Bei den BSE-Nachkommen waren von 181 Proben 29 (16.1 %), bei den Kontrolltieren von 134 Proben 6 (4.5 %) positiv. Die Häufigkeitsverteilungen der beiden Gruppen unterschieden sich signifikant ($P < 0.05$). Unter den im letzten Jahr der Inkubationszeit von BSE beim Muttertier geborenen Nachkommen wurde bei signifikant mehr Tieren PrP^{res} im Blut nachgewiesen als bei den restlichen BSE-Nachkommen.

Bis heute wurde kein sich von PrP^{Sc} unterscheidendes bovines Prion Protein im Blut gefunden, welches Protease-resistent ist. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass es sich bei dem von uns nachgewiesenen Protease-resistenten Prion Protein um PrP^{Sc} handelt.

2. SUMMARY

The aim of the present study was to test the offspring of swiss cattle with BSE for presence of protease-resistant prion protein (PrP^{res}) in the blood. Frequency of PrP^{res} detection in a BSE-offspring group (181 animals) was compared with the results from a control group, composed of 134 healthy control animals and their 106 respective dams. Blood samples were analyzed for PrP^{res} with the Alicon PrioTrap[®] test. In the BSE-offspring group 29 out of 181 animals (16.1%) resulted positive, while in the control group 6 out of 134 (4.5%) gave a positive result. The frequency distribution of the two groups varied significantly ($P < 0.05$).

PrP^{res} was detected significantly more often in BSE-offspring born in the mother's last year of incubation of BSE than in BSE-offspring born earlier. Given that to date no protease-resistant bovine prion protein other than PrP^{Sc} was ever reported in the blood, the protease-resistant prion protein detected in the present study is in all probability PrP^{Sc} .

3. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Das epidemische Ausmass der bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE) hat die Öffentlichkeit in den Neunzigerjahren des letzten Jahrhunderts weltweit in ihren Bann gezogen. Unter anderem verankerte sich in der Bevölkerung die Vermutung, dass BSE vom infizierten Rind auf den Menschen übertragen werden kann und sich beim Menschen als die „neue-Creutzfeld-Jakob-Krankheit“ (nCJD) manifestieren würde. Dieser Übertragungsweg konnte anhand ausgiebiger Forschungsarbeiten nicht nachvollzogen werden. Vielmehr ist bei den nCJD-Fällen in Grossbritannien bewiesen worden, dass die nCJD per Bluttransfusion von Mensch zu Mensch übertragen wurde (COLLEE et al., 2006). Ausgangspunkt für diese Infektionskette war ein Blutspender, welcher sich im präklinischen Stadium der nCJD befand. Trotz dieser Erkenntnisse konnte die Bevölkerung nicht nachhaltig überzeugt werden, dass BSE bis heute die Speziesbarriere Rind-Mensch nicht überwunden hat.

In einer vom britischen Landwirtschaftsamt in Auftrag gegebenen Kohortenstudie wurde festgestellt, dass bei Nachkommen von BSE-Kühen signifikant häufiger BSE diagnostiziert werden konnte als bei Nachkommen von Kühen, welche nie an BSE erkrankten. Dem zu Folge stellte die Abstammung einer BSE-Kuh eine Risikopopulation dar, aus welcher mit BSE-Fällen zu rechnen war. Dieser Studie wurde von den schweizerischen Behörden Beachtung geschenkt und die Tierseuchenverordnung wurde angepasst. Alle 182 in der Schweiz lebenden BSE-Nachkommen wurden 1996/97 wissenschaftlich untersucht, getötet und vernichtet. Bei keinem Tier wurde damals klinisch BSE diagnostiziert und PrP^{Sc} wurde bei keinem Tier im Hirnhomogenat nachgewiesen.

Zurzeit gibt es weltweit keinen zugelassenen Test, mit dem Rinder *in vivo* auf BSE untersucht werden können. Die bisherigen Tests beruhen auf dem Nachweis spezifischer histologischer Veränderungen im Gehirn, der immunhistochemischen Untersuchung des Gehirns und auf dem Nachweis des Erregers im Hirnhomogenat. Weltweit haben sich jedoch verschiedene Forschergruppen der

Entwicklung eines BSE-Tests verschrieben, welcher am lebenden Tier durchgeführt werden kann. Eine dieser Gruppen hat unter ihrem Leiter Dr. Ralph Zahn eine Nachweismethode von Protease-resistentem Prion Protein (PrP^{res}) im Blutplasma entwickelt. Dieses Testprinzip ist zur Patentierung angemeldet und befindet sich zurzeit in der Evaluation durch die schweizerischen Behörden.

Das Ziel dieser Dissertation war es, zu untersuchen, ob unter den in der Schweiz 1996/97 getöteten BSE-Nachkommen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe vermehrt Tiere vorhanden waren, bei welchen PrP^{res} im Blutplasma vorkam. Auch sollte, in Anlehnung an die britische MAFF-Studie, untersucht werden, ob die Geburt des Nachkommens in verschiedenen Abschnitten der mütterlichen Inkubationszeit einen Einfluss auf seinen BSE-Status hat.

4. LITERATURÜBERSICHT

4.1. BSE

4.1.1. Definition

Die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) ist eine sporadische, chronisch-progressiv und tödlich verlaufende, transmissible neurodegenerative Krankheit der adulten Rinder (HAURI, 2004).

4.1.2. Das natürliche Prion Protein

Beim Prion Protein (proteinaceous infectious particle, PrP^C) handelt es sich um ein Eiweiss, welches im menschlichen wie auch im tierischen Organismus natürlicherweise und ausschliesslich in der α -helikalen Strukturkonformation vorkommt. Prion Protein kann vornehmlich auf Gliazellen, Neuronen und Zellen des lymphoretikulären Systems im Nervensystem und Gehirn gefunden werden (AGUZZI, 2002). Es kommt vor allem an deren Zelloberfläche vor und schützt die Zellen vor zweiwertigen Kupferionen, Wasserstoffperoxid und freien Radikalen. Im Weiteren wird vermutet, dass es einer der ersten Sensoren in der zellulären Abwehr von reaktivem Sauerstoff und freien Radikalen ist und Auswirkungen auf den enzymatischen Abbau von freien Radikalen hat (WATT und HOOPER, 2005).

4.1.3. Das Prion Protein Scrapie (PrP^{Sc}) als BSE-Erreger

Prusiner identifizierte eine Isoform des normalen PrP^C, das PrP^{Sc} als Erreger der Scrapie beim Schaf (PRUSINER, 1982). Diese Isoform liegt in elektronenmikroskopisch gefundenen Scrapie assoziierten Fibrillen (SAF) vorwiegend in der β -Faltblatt-Struktur vor (RIEK et al., 1997). Das PrP^{Sc} ist charakterisiert durch eine ausserordentlich hohe Tenazität gegenüber Umwelteinflüssen und auch gegen verschiedene technische Behandlungen (GLATZEL et al., 2002).

Insbesondere ist die partielle Resistenz gegen Proteaseverdauung von grösster diagnostischer Relevanz (McKINLEY et al., 1983), da das normal vorkommende PrP^C durch Proteasen vollständig verdaut wird. PrP^{Sc} gilt heute allgemein als Erreger von spongiformen Enzephalopathien bei den verschiedenen Spezies (PRUSINER, 1998). So wurde PrP^{Sc} auch als das infektiöse Agens bei BSE identifiziert (PRUSINER, 1998). Das in eine Zelle aufgenommene PrP^{Sc} katalysiert die strukturelle Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc}. Dieses konvertierte PrP^{Sc} hat eine starke Tendenz, wasserunlösliche Polymere zu bilden, welche neurohistologisch als Amyloid-Plaques identifiziert wurden und zu einer Neurodegeneration mit spongiösen Veränderungen führen (AGUZZI, 2002). Diese neurodegenerativen Befunde sind lichtmikroskopisch auch beim an BSE erkrankten Rind zu finden.

Das aus diesen Veränderungen resultierende klinische Bild der BSE wurde von HAURI (2004) ausführlich anhand der Untersuchungen bei 53 Kühen mit BSE vorgestellt.

4.1.4. Spongiforme Enzephalopathien bei anderen Tierarten

In der Familie der Hornträger (Bovidae) wurden transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSE) ausser beim Rind auch beim Schaf und bei der Ziege, sowie bei Antilopenartigen nachgewiesen. Weiter erkrankten bisher verschiedene Spezies der Familien der Cervidae (Hirschartige), der Felidae (Katzenartige) und Mustelidae (Marderartige) an einer TSE (ANONYM, 2005).

4.2. Maternale Transmission von BSE

4.2.1. Mögliche Wege der maternalen Transmission von BSE

4.2.1.1. Pränatale Übertragung

In Uterus- und Plazentargewebe sowie in den Fruchtblässigkeiten von an BSE erkrankten Kühen konnte bis heute kein PrP^{Sc} nachgewiesen werden. Es wird deshalb bis heute nicht von einer transplazentären Infektion ausgegangen (HEIM und KIHLM, 2003).

4.2.1.2. Perinatale Übertragung

Speichel, Tränenflüssigkeit und Kot von an BSE erkrankten Kühen gelten als frei von PrP^{Sc}. Einzig im Urin von an BSE erkrankten Kühen konnte ein Protein isoliert werden, welches sich im elektrophoretischen Auftrennungsmuster analog dem Muster von PrP^{Sc} darstellt. Die Infektiosität dieses Proteins wurde jedoch nicht nachgewiesen (SHAKED et al., 2001). Grundsätzlich gilt der perinatale Infektionsweg für BSE beim Rind als unwahrscheinlich (HEIM und KIHLM, 2003).

4.2.1.3. Laktogene Übertragung

Milch, Milchdrüsengewebe und supramammäre Lymphknoten von an BSE erkrankten Kühen wurden Mäusen unter anderem auch intracerebral inokuliert. Keine der für BSE empfänglichen Mäuse zeigte weder intra vitam noch post mortem spezifische Anzeichen für BSE (TAYLOR et al., 1995). Auch in neueren Untersuchungen wurde in der Milch von klinisch an BSE erkrankten Tieren ebenfalls kein PrP^{Sc} gefunden (EVEREST et al., 2006).

Nachkommen von BSE-Kühen aus Mutterkuhhaltung

Um die Aussage zu unterlegen, dass die Milch von an BSE erkrankten Kühen keine Infektionsquelle für deren Nachkommen darstellt, wurden 234 Nachkommen von an BSE erkrankten Mutterkühen retrospektiv abgeklärt. Es wurde sichergestellt, dass sie als Kälber mindestens einen Monat lang Milch von ihrem nachträglich an BSE erkrankten Muttertier getrunken hatten. Das Alter dieser BSE-Nachkommen lag zwischen 1 und 10 Jahren. Bei keinem dieser Tiere wurden klinische Anzeichen von BSE beobachtet. Dies sprach dafür, dass die Milch von BSE-Tieren kaum eine Infektionsquelle darstellt (WILESMITH und RYAN, 1997). Bei diesen Tieren wurden jedoch weder neurohistologische noch immunhistochemische Untersuchungen des Gehirns durchgeführt.

4.2.2. Maternale Transmission bei anderen TSE's von Tieren

Grundsätzlich konnte die maternale Transmission ausser bei Scrapie bei keiner TSE nachgewiesen werden. In den plazentären Kotyledonen von präklinischen und klinisch kranken Scrapie-Schafen wurde PrP^{Sc} gefunden (ANDREOLETTI et al., 2002). Die infizierte Schafplazenta ist eine wichtige orale Infektionsquelle für Lämmer. Gerade bei Geburten auf der Weide stellt sie aber auch für weitere Schafe eine Infektionsquelle dar (= horizontale Übertragung). Ob ein Lamm aus einem mit PrP^{Sc} infizierten Mutterschaf ebenfalls an Scrapie erkrankt, hängt jedoch wesentlich von seinem Genotyp ab (4.3.3.).

4.2.3. Erste Vermutung einer maternalen Transmission von BSE

Im Dezember 1990 wurde bekannt, dass im Londoner Zoo eine 1.5-jährige Antilope an BSE erlag. Die Antilope konnte nicht mit dem infektiösen Agens peroral in Kontakt gekommen sein, da ihr nie tierische Produkte verfüttert worden waren. Das Muttertier dieser Antilope war jedoch bereits 1989 an einer spongiformen Enzephalopathie gestorben. Die maternale Transmission einer TSE wurde bis dahin nur bei Scrapie vermutet (BRUGÈRE-PICOUX et al., 2005). Der Fall

der Antilope liess den Verdacht aufkommen, dass maternale Transmissionen auch bei mit BSE infizierten Rindern vorkommen könnten (ALDHOUS, 1990).

4.2.4. Erster Fall einer maternalen Transmission von BSE

In Grossbritannien erkrankte 1991 eine Kuh an BSE, bei deren Muttertier 1989 ebenfalls BSE diagnostiziert worden war. Die Kuh war drei Monate nach dem britischen Tiermehl-Fütterungsverbot von 1988 geboren worden, wodurch eine orale Infektion mit dem BSE-Erreger als unwahrscheinlich erachtet wurde (ALDHOUS, 1991). Dieser wahrscheinlich erste Fall einer maternalen Transmission von BSE von einer Kuh auf ihr Kalb rief nach weiterführenden Untersuchungen zur Übertragbarkeit.

4.2.5. Maternale Transmission bei BSE-Nachkommen in England

Das Ziel dieser durch das MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food) lancierten Studie war, 301 direkte BSE-Nachkommen und 301 Kontrolltiere in der gleichen Altersverteilung bis zum Erreichen des siebten Altersjahres regelmässig auf klinische Anzeichen von BSE zu untersuchen. Die Muttertiere der Kontrollgruppe mussten das sechste Altersjahr ohne Anzeichen von BSE erreicht haben. Auch wurde darauf geachtet, dass der BSE-Nachkomme und das entsprechende Kontrolltier aus der gleichen Herde stammten und in der gleichen Abkalbesaison geboren worden waren. Sowohl die BSE-Nachkommen als auch die Kontrolltiere wurden an ihrem siebten Geburtstag getötet, sofern sie nicht schon vorher als natürlicher Abgang oder wegen BSE getötet werden mussten. Sowohl die Gehirne der BSE-Nachkommen als auch die der Kontrollgruppe wurden neuropathologisch auf BSE untersucht.

Erste Resultate dieser Untersuchung wurden aufgrund des immensen nationalen und internationalen Interesses vor Abschluss der Studie veröffentlicht (SEAC, 1996). Diese damals publizierten provisorischen Ergebnisse wurden im Nachhinein bestätigt. Bei 42 (14 %) der 301 BSE-Nachkommen wurden die für

BSE typischen spongiösen Veränderungen im Gehirn gefunden. Von den 301 Nachkommen von nicht an BSE erkrankten Müttern wurde bei 13 Tieren (4.3 %) post mortem BSE diagnostiziert (SEAC, 1996). Aus diesem statistisch signifikanten Resultat wurde geschlossen, dass das effektive Risiko eines BSE-Nachkommens, selber an BSE zu erkranken, gegenüber einem Nicht-BSE-Nachkommen bei ca. 10 % liegt (SEAC, 1996). Die Studie lieferte Anhaltspunkte, dass eine maternale Transmission von BSE vorkommen könnte. Eine Aussage über den Weg der Übertragung war jedoch nicht möglich.

4.2.5.1. Möglicher genetischer Einfluss auf die BSE-Erkrankung

Die Resultate der MAFF-Kohortenstudie (4.2.5.) wurden anhand von verschiedenen genetischen Standardmodellen untersucht. Das Ziel war, nachzuweisen, ob BSE beim Muttertier und deren Nachkommen eventuell ausschliesslich genetisch bedingt sein könnte. Die Ergebnisse wurden dahingehend interpretiert, dass sowohl die maternale Übertragung als auch eine genetische Prädisposition die in der Studie aufgetretenen BSE-Fälle erklären können. Ein eindeutiger Hinweis für eine rein genetische Ursache konnte nicht gefunden werden. Die Autoren schlossen daraus, dass am ehesten eine Kombination von maternaler Übertragung und genetischer Prädisposition für die erhöhte Inzidenz von BSE bei den BSE-Nachkommen im Vergleich zur Kontrollgruppe verantwortlich war (FERGUSON et al., 1997).

4.2.5.2. Einfluss des Geburtszeitpunktes in der Inkubationszeit

Laut der MAFF-Studie (4.2.5.) war das Risiko eines BSE-Nachkommens, selbst an BSE zu erkranken, signifikant höher, wenn seine Geburt in die letzten 12 Monate vor dem Einsetzen der klinischen BSE-Symptome beim Muttertier fiel oder wenn das Muttertier schon klinische Symptome zeigte (DONNELLY et al., 1997). Dies weist darauf hin, dass bei BSE-Nachkommen eher eine maternale Übertragung als eine genetische Prädisposition für BSE verantwortlich ist

(DONNELLY et al, 1997). Obwohl der Übertragungsweg nicht nachgewiesen werden konnte, wird eine pränatale Infektion des BSE-Nachkommens vermutet.

4.2.6. BSE-Nachkommen in der Schweiz

In der MAFF-Kohortenstudie (4.2.5.) wurde festgehalten, dass eine Übertragung von BSE von der Kuh auf das Kalb nicht ausgeschlossen werden kann. Der schweizerische Bundesrat beschloss deshalb per 1. Oktober 1996, dass alle Nachkommen von BSE-Kühen getötet und vernichtet werden mussten. Damit sollte verhindert werden, dass sich in der schweizerischen Rinderpopulation wissentlich eine Tiergruppe befand, aus welcher mit BSE-Fällen zu rechnen war. Damit ein möglichst grosser Erkenntnisgewinn erzielt werden konnte, wurden diese BSE-Nachkommen detailliert untersucht (BRAUN et al., 1998; FATZER et al., 1998). Die 182 BSE-Nachkommen waren 0.1 bis 9.6 Jahre alt (3.1 ± 0.8 Jahre) und wurden an der Klinik für Wiederkäuer der Universität Zürich eingehend klinisch und neurologisch untersucht. Zudem wurden ihnen Blut-, Milch-, Harn-, Pansensaft- und Liquorproben entnommen. Anhand des speziellen Untersuchungsganges auf BSE (BRAUN et al., 1997) wurden das Verhalten, die Sensibilität und der Bewegungsablauf dieser Tiere beurteilt. Bei keinem Tier wurde anhand dieser Untersuchung BSE diagnostiziert, wobei bei 9 Tieren BSE aufgrund deutlich ausgeprägter Sensibilitätsstörungen nicht ausgeschlossen werden konnte. Anschliessend an die Untersuchungen wurden die Tiere euthanasiert und seziert. Das Gehirn wurde immunhistochemisch und mit dem Prionics[®]-Check WESTERN sowie neurohistologisch auf BSE untersucht (FATZER et al., 1998). Bei keinem Tier konnte die pathogene Isoform des PrP-Proteins (PrP^{Sc}) nachgewiesen werden. Auch wurden bei keinem Tier die für BSE typischen Läsionen im Gehirn gefunden. Die Resultate aus diesen postmortalen Untersuchungen auf BSE stimmten mit der klinischen Untersuchung auf BSE überein (BRAUN et al., 1997).

Die Ergebnisse der MAFF-Studie wurden durch die schweizerischen Untersuchungen nicht unterstützt. Eine dafür mögliche Erklärung lag in der relativ kleinen Gesamtzahl der Tiere und dem tiefen Durchschnittsalter der untersuchten BSE-Nachkommen (FATZER et al., 1998).

4.3. Genetisch bedingte Empfänglichkeit für BSE

4.3.1. Genetische, rassenunabhängige Prädisposition für BSE

Die Möglichkeit, dass eine Prädisposition für BSE durch Mutationen im bovinen PrP-Gen bedingt sein könnte, wurde anfänglich ausgeschlossen (HUNTER et al., 1994). Einzig ein 23 Basenpaare grosser Insertions-/Deletionspolymorphismus in der Region des Promotors für das Prion-Protein-Gen konnte mit einer erhöhten Empfänglichkeit für BSE verbunden werden (SANDER et al., 2004). Bis heute wurden keine weiteren Studien durchgeführt, welche eine rassenunabhängige genetische Prädisposition für BSE nachhaltig nachgewiesen hätten.

4.3.2. Rassenbedingte Prädisposition für BSE

Epidemiologische Daten aus Bayern weisen darauf hin, dass Braunvieh-Rinder empfänglicher für BSE sind als Rinder anderer Rassen (SAUTER-LOUIS et al., 2006). Es wurde gezeigt, dass dies sowohl hinsichtlich einer höheren Prävalenz als auch einer kürzeren Inkubationszeit zutraf (CLAUSS et al., 2006). Braunvieh war unter den BSE-Fällen überproportional vertreten. 27 % der in Bayern an BSE erkrankten Tiere gehörten zur Rasse Braunvieh, obwohl nur 9 % der empfänglichen Population Braunviehrinder waren. Wesentlich war auch, dass in Bezug auf die Fütterungspraxis keine Unterschiede zwischen an BSE erkrankten Braunviehrindern und Rindern anderer Rassen bestanden. Deshalb wurde vermutet, dass die ungleiche Verteilung der BSE-Fälle in Bayern innerhalb der Rinderrassen auf genomische Unterschiede zurückzuführen war. Weitere Unter-

suchungen zur Abklärung dieser Vermutung ergaben, dass im Prion-Protein-Gen von Braunviehrindern mehr Octapeptid-Wiederholungen als in demjenigen anderer Rassen vorhanden waren (SAUTER-LOUIS, 2006). Dies könnte eine kürzere Inkubationszeit und eine erhöhte Empfänglichkeit erklären.

4.3.3. Genetisch bedingte Empfänglichkeit für TSE's bei Tieren

Die genetisch bedingte Empfänglichkeit einer TSE bei Tieren wurde bis heute nur bei Scrapie am Schafmodell abschliessend untersucht. Die Empfänglichkeit für Scrapie ist hauptsächlich durch Polymorphismen am PrP-Gen, welches für das PrP^C-Protein codiert, determiniert (ANDREOLETTI, 2002). Die wichtigsten Punktmutationen, welche mit Empfänglichkeit oder Resistenz einhergehen, befinden sich an den Codons 136 (Alanin oder Valin), 154 (Arginin oder Histidin) und 171 (Arginin, Glutamin oder Histidin). Schafe und Lämmer, welche die Mutationen Alanin-Arginin-Arginin homozygot aufweisen, sind genetisch resistent für Scrapie. Diejenigen Schafe, welche am PrP-Gen heterozygote Alanin-Histidin-Glutamin- oder Alanin-Arginin-Arginin-Mutationen aufweisen, sind nur marginal empfänglich. Schafe ohne die genannten Mutationen gelten als hochempfänglich für Scrapie. In England und Neuseeland werden deshalb seit einigen Jahren vornehmlich Mutterschafe mit genetisch bedingter Scrapie-Resistenz in der Zucht eingesetzt (ANDREOLETTI et al., 2002).

4.4. Infektiosität von Spermien, Eizellen und Embryonen

4.4.1. Nachkommen von an BSE erkrankten Stieren

35 F1-Nachkommen (= 1. Generation) von zwei an BSE erkrankten britischen Stieren wurden retrospektiv auf das Vorkommen von BSE untersucht. Diese Gruppe wurde einer Kontrollgruppe mit der gleichen Altersverteilung gegenübergestellt, welche von zwei Nicht-BSE-Stieren abstammte. Die Ergebnisse zeigten, dass keine statistisch signifikanten Anhaltspunkte für eine paternale

Übertragung gefunden werden konnten. Aufgrund dieser Resultate wurde auch eine Vererbung der Erkrankung väterlicherseits ausgeschlossen (CURNOW und HAU, 1996).

4.4.2. Embryonen aus an BSE erkrankten Elterntieren

167 Kühe mit eindeutigen klinischen Symptomen von BSE wurden mit Sperma von 13 Stieren künstlich besamt. Acht dieser 13 Samenspende zeigten ebenfalls eindeutige klinische Symptome von BSE. Die eine Woche nach der künstlichen Besamung gewonnenen Embryonen wurden nach dem üblichen Schema als „sehr gut“ und als „gut“ klassifiziert. Die sehr guten Embryonen wurden in 347 Trägartiere transferiert. Damit ausgeschlossen werden konnte, dass die Trägartiere in ihrem Leben jemals mit dem BSE-Erreger in Kontakt gekommen waren, wurden sie aus Neuseeland importiert. Neuseeland gilt bis heute als frei von BSE (O.I.E., 2006) und Scrapie (BVET, 2006a). Aus den transferierten Embryonen wurden 134 Tiere geboren, deren Vater und Mutter an BSE erkrankt waren. Die 134 Tiere und ihre Leihmütter wurden während sieben Jahren auf klinische Anzeichen von BSE untersucht. Danach wurden die Tiere geschlachtet, und das Gehirn wurde neurohistologisch und immunhistochemisch untersucht. Bei keinem Tier konnte BSE nachgewiesen werden.

Die verbleibenden 1020 Embryonen minderer Qualität wurden intracerebral in für BSE-empfindliche Mäuse inokuliert (20 Embryonen/Maus). Die Mäuse wurden 700 Tage überwacht und ihre Gehirne wurden danach neurohistologisch auf spongiforme Läsionen untersucht. Bei keiner Maus konnten BSE-typische Läsionen gefunden werden. Daraus wurde geschlossen, dass Embryonen keine Träger von infektiösem BSE-Material sind und dass die Krankheit auch per Embryotransfer nicht übertragen wird (WRATHALL et al., 2002).

4.5. Übertragung von BSE mittels Produkten tierischer Herkunft

In einer epidemiologischen Studie konnte auf eine Übertragung des Erregers mittels Tiermehl und Talg im Futter geschlossen werden (WILESMITH et al., 1988). Heute gilt als gesichert, dass die Hauptinfektionsquelle Tiermehl von mit PrP^{Sc} infizierten Schafen und Rindern ist. Auch den schweizerischen Rindern wurde dieses Tiermehl als hochwertiges Proteinsupplement verfüttert (HEIM und KIHLM, 2003).

4.6. Iatrogene Übertragungswege von BSE

Theorien, welche die Übertragung mittels Impfungen, Hormonen, Insektiziden oder Anthelmintika vermuteten, konnten in einer breit gefächerten epidemiologischen Studie nicht nachvollzogen werden (WILESMITH und RYAN, 1992).

4.7. Übertragbarkeit von BSE auf den Menschen

Beinahe 170 Menschen sind bisher weltweit an der neuartigen Creutzfeld-Jakob-Erkrankung (nCJD) verstorben (COLLEE et al., 2006). In der Bevölkerung wird die nCJD mit einer Übertragung von BSE vom Rind auf den Menschen assoziiert. Lymphatisches Gewebe und peripheres Nervengewebe sowie Muskelgewebe von an BSE erkrankten Rindern wurden anhand modernster Techniken untersucht, ohne dass der BSE-Erreger gefunden werden konnte (BRADLEY et al., 2006). Auch konnte eine direkte Übertragung des infektiösen Agens vom Rind auf den Menschen bis heute nicht nachgewiesen werden. Als wahrscheinlichster Infektionsweg werden Blutkonserven angesehen, welche von einem präklinischen nCJD-Patienten stammten (COLLEE et al., 2006). Bei 159 (99.4 %) von 160 an nCJD erkrankten Personen wurde in der genetischen Analyse des Prion-Protein-Gens eine Homozygotie für Methionin am polymorphen Codon 129 festgestellt. Diese Homozygotie wird mit einer erhöhten

Empfänglichkeit für die nCJD in Verbindung gebracht (KOBAYASHI et al., 2005).

4.8. BSE-Labordiagnostik

4.8.1. Einleitung

Im Unterschied zu den durch Viren und Bakterien ausgelösten infektiösen Erkrankungen sind Prionenerkrankungen mit den herkömmlichen diagnostischen Methoden nicht nachzuweisen. Da das PrP^{Sc} keine Nukleinsäure enthält und nur aus einem abnormal gefalteten zellulären Protein besteht, wird es vom Wirtsorganismus nicht erkannt. Entsprechend fehlen eine entzündliche und auch eine immunologische Reaktion. Zudem akkumuliert PrP^{Sc} im Nervengewebe; es liegt also keine gleichmässige Verteilung im Gewebe vor. Insbesondere wurde infektiöses PrP^{Sc} in einfach zugänglichen Körperflüssigkeiten wie Blut und Urin bisher nicht nachgewiesen (KÜBLER et al., 2003). Die Diagnose BSE kann deshalb bis heute nur anhand von Hirngewebe, also post mortem, gestellt werden. Es gibt momentan weltweit keine Testmethode, welche PrP^{Sc} ante mortem detektieren kann und als diagnostischer Test offiziell anerkannt ist (RÄBER und OESCH, 2006).

4.8.2. Neurohistologie als Gold-Standard

Seit Beginn der BSE-Diagnostik wurden die typischen Veränderungen wie die spongiöse, mit Vakuolen durchsetzte Hirnbeschaffenheit, die Amyloid-Plaques und die Astrozytengliose nachgewiesen. Bis heute gelten diese histopathologischen Befunde als Gold-Standard in der BSE-Diagnostik. Es werden deshalb bei jedem Verdachtsfall neurohistologische Untersuchungen zur Beurteilung der klinischen oder der immunhistochemischen Diagnose durchgeführt (RÄBER und OESCH, 2006).

4.8.3. In der Schweiz zugelassene BSE-Tests

Die Entdeckung von PrP^{Sc} als Ursache von BSE legte den Grundstein für die heute verbreiteten und millionenfach angewandten BSE-Schnelltests. PrP^{Sc} konnte als der molekulare Marker für die BSE-Erkrankung genutzt werden (KÜBLER et al., 2003). Insbesondere die Identifikation des Protease-resistenten Kernstücks des PrP^{Sc} legte den Grundstein für die diversen, auf immunologischen Prinzipien basierenden Testmethoden (RÄBER und OESCH, 2006).

Aktuell sind von den schweizerischen Behörden (Stand Herbst 2006) fünf BSE-Tests anerkannt. Der *Prionics*[®]-*Check WESTERN*, der *Prionics*[®]-*Check LIA* und der *Prionics*[®]-*Check Priostrip* wurden von der schweizerischen Firma Prionics AG entwickelt. Der *TeSeE Test*[®] wurde von der Firma Bio-Rad (USA) entwickelt und das *Enfer TSE Kit*[®] Version 2.0 von der Firma Enfer Scientific (Irland).

Nachfolgend wird nur auf den *Prionics*[®]-*Check WESTERN* eingegangen, da dieser Test in der Schweiz im Rahmen der BSE-Überwachung und der Untersuchung bei Verdachtsfällen verwendet wird.

4.8.3.1. Der *Prionics*[®]-*Check WESTERN*

Beim *Prionics*[®]-*Check WESTERN* handelt es sich um ein automatisiertes Verfahren, bei dem das Hirnmaterial zuerst homogenisiert wird. Danach wird das Homogenat mit einer Protease behandelt, wodurch möglichst alle vorhandenen Proteine verdaut werden. Die Probe wird anhand einer Gelelektrophorese aufgetrennt, um danach die PrP^{Sc} per Chemilumineszenz zu detektieren. Das PrP^{Sc}-immunoreaktive Signal, die Laufstrecke sowie das typische drei-Banden-Muster (die drei verschiedenen Glykosilierungsstufen des PrP^{Sc}) sprechen zusammen für einen Nachweis von PrP^{Sc} in der entsprechenden Probe.

Der Test zeichnet sich durch eine 100%-ige Sensitivität und Spezifität aus. Er wurde in der Schweiz, Europa, Amerika und Asien millionenfach eingesetzt (RÄBER und OESCH, 2006).

4.8.4. Diagnostik am lebenden Tier

Bis heute sind weltweit noch keine Testmethoden zur Diagnostik am lebenden Tier anerkannt. Verschiedene Firmen sind jedoch daran, Testmethoden zu entwickeln, um das Vorkommen von PrP^{res} in verschiedenen Geweben und Körperflüssigkeiten von Mensch und Tier nachzuweisen (DEALLER, 2005). Bis heute wurden allerdings noch keine Parameter gefunden, welche vorbehaltlos mit einer TSE in Verbindung gebracht werden können.

5. MATERIAL UND METHODIK

Blutproben von zwei Tiergruppen wurden auf das Vorhandensein von Protease-resistentem Prion Protein untersucht. Bei der einen Gruppe (A) handelte es sich um 181 Nachkommen von BSE-Kühen, bei der anderen (B) um eine analog zusammengesetzte Vergleichsgruppe.

5.1. Tiergruppe A: BSE-Nachkommen

Die Gruppe A bestand aus 181 Nachkommen von BSE-Kühen, die im Winter 1996/97 auf Anordnung des schweizerischen Bundesrats an der Klinik für Wiederkäuer untersucht und danach euthanasiert worden waren (BRAUN et al., 1998). Die anschliessende postmortale Untersuchung hatte ergeben, dass bei keinem der Tiere Hinweise auf BSE bestanden (FATZER et al., 1998). Für den Nachweis von Protease-resistentem Prion Protein stand von jedem Tier eine Blut-plasmaprobe zur Verfügung, die seit 1996/97 bei -80 °C gelagert worden war.

5.1.1. Aufarbeitung von Daten der Muttertiere und der Nachkommen

Zum Zeitpunkt der Eradikation der BSE-Nachkommen lagen der Klinik für Wiederkäuer keine Informationen über deren Mütter vor. Diese Informationen wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation nachträglich beim Bundesamt für Veterinärwesen eingeholt (Tab. 1). Insbesondere interessierten das Alter der Muttertiere zum Zeitpunkt der BSE-Diagnose, die Anzahl der Nachkommen und die Verwandtschaftsverhältnisse der BSE-Nachkommen untereinander. Die tabellarische Auswertung dieser Daten liess eine altersabhängige Einteilung der Mutter-Nachkommen-Paare zu (Tab. 2).

Tab. 1: Daten der BSE-Muttertiere und deren Nachkommen

BSE-Muttertier	BSE-Nachkommen
Geburtsdatum	Geburtsdatum
Alter bei der Diagnose BSE	Alter zum Zeitpunkt, als beim Muttertier BSE diagnostiziert wurde
Anzahl, Alter und Geschlecht der Nachkommen	Anzahl, Alter und Geschlecht der Geschwister
	Alter zum Zeitpunkt der Untersuchung am Tierspital

14 Kühe waren zum Zeitpunkt der BSE-Diagnose 4 Jahre alt. Sieben ihrer Nachkommen waren zum Zeitpunkt der Untersuchung und Euthanasie 1 Jahr alt, zwei waren 6 Jahre alt und je ein Nachkomme war 2, 3, 4, 8 und 10 Jahre alt. Die Anzahl und das Alter der BSE-Nachkommen der 5-, 6-, 7-, 8- und 9-jährigen BSE-Kühe gehen aus der Tabelle 2 hervor. 13 BSE-Nachkommen waren gleich alt oder älter als das an BSE erkrankte Muttertier, da die Nachkommen der zwischen 1990 und 1996 erkrankten Kühe erst 1996/97 getötet werden mussten. Aus dem gleichen Grund existierten auch 34 Paare, bei denen der Altersabstand in der Tabelle 2 zwei Jahre oder weniger betrug.

Tab. 2: Altersabhängige Einteilung der Mutter-Nachkommenpaare

Alter der BSE-Muttertiere (Jahre)	Alter der BSE-Nachkommen (Jahre)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
4 (n = 14)	7	1	1	1		2		1		1
5 (n = 28)	4	12	4	2	1	2	2		1	
6 (n = 75)	11	21	23	14	5	1				
7 (n = 46)	4	13	6	16	3	3		1		
8 (n = 16)	5	4	2	3	1	1				
9 (n = 2)			1		1					

5.1.2. Geschwisterverhältnisse unter den 181 BSE-Nachkommen

Die detaillierten Geschwisterverhältnisse unter den BSE-Nachkommen gehen aus der Tabelle 3 hervor. So hatten beispielsweise 15 Kühe im Alter von 4 bis 8 Jahren einen einjährigen Nachkommen, eine 4-jährige Kuh hatte einjährige Zwillinge und 7 Kühe im Alter von 4 bis 7 Jahren hatten je einen ein- und zweijährigen Nachkommen. Die grösste Nachkommenzahl von 4 wies eine 8-jährige BSE-Kuh auf, deren Nachkommen 1, 2, 4 und 5 Jahre alt waren.

Tab. 3: Verwandtschaftsverhältnisse unter den 181 BSE-Nachkommen (Alter in Jahren)

Alter der BSE-Nachkommen und ihrer Geschwister	Alter der BSE-Muttertiere					
	4	5	6	7	8	9
1	4	1	6	2	2	
1+1	1					
1+2	1	1	3	2		
1+3					1	
1+1+2		1	1			

Fortsetzung von Tab. 3

Alter der BSE-Nachkommen und ihrer Geschwister	Alter der BSE-Muttertiere					
	4	5	6	7	8	9
1+2+4					1	
1+2+4+5					1	
2	1	10	13	4	1	
2+2				1		
2+3			4	1	1	
2+4				3		
2+3+4				1		
3	1	4	19	2		1
3+4				2		
4	14	2	5	10	1	
5	1	1	5	3	1	1
6	2	2	1	3	1	
7		2	3			
8	1			1		
9		1				

78 BSE-Nachkommen (43 %) waren ohne Geschwister, 21 Tiere (11.6 %) wiesen ein Geschwister, 4 Tiere (2.2 %) zwei und ein Tier drei Geschwister auf. Zweimal handelte es sich um Zwillinge, die ein bzw. 2 Jahre alt waren.

5.1.3. Rassenverteilung

98 Tiere gehörten der Fleckvieh-, 70 Tiere der Braunvieh-, 12 Tiere der Holstein-Friesian- und ein Tier der Erringerrasse an (BRAUN et al., 1998).

5.2. Tiergruppe B: Gesunde Kontrollpopulation

Um abzuklären, ob sich die Häufigkeit des Nachweises von Protease-resistentem Prion Protein bei Nachkommen von BSE-Kühen und bei Nachkommen von gesunden Kühen unterscheidet, wurde eine Population von gesunden Kontrolltieren untersucht. Das Ziel war es, von jeweils einer gesunden Kuh und deren Nachkommen Blut zu untersuchen. Die Altersverteilung von Mutter und Nachkommen sollte exakt der Altersverteilung der BSE-Nachkommen und deren an BSE erkrankten Mütter entsprechen. Für 47 BSE-Nachkommen (26 %) und deren Mütter war es aus verschiedenen Gründen nicht möglich, ein gesundes Vergleichspaar zu finden. Diese Tiere wurden deshalb aus der Untersuchung ausgeschlossen. Die Tiergruppe B setzte sich aus 134 gesunden Nachkommen und deren 106 Mütter zusammen (Tab. 4). Alle Tiere stammten aus dem Raum Ilanz (Vorderrheintal, Graubünden) und gehörten der Schweizer Braunviehrasse an. Sie stammten von insgesamt 61 Tierhaltern und waren laut Aussage ihrer Besitzer klinisch gesund. Pro Tier wurden 20 ml Blut aus der Jugularvene in mit Natrium-Citrat versetzte Vakuumröhrchen (Vacutainer[®] SST, 6 ml, Becton Dickinson AG, Basel) entnommen. Die Blutproben wurden innerhalb von 2 Stunden während 15 Minuten bei 2000 g zentrifugiert. Danach wurde das Plasma abgehebert und bis zur weiteren Untersuchung im Labor bei -20 °C gelagert.

Tab. 4: Zusammensetzung der Gruppe B (134 Nachkommen und 106 Mütter, Alter in Jahren)

Alter der Nachkommen und deren Geschwister	Alter der Muttertiere					
	4	5	6	7	8	9
1	4	1	6	2	2	
1+1	1					
1+2	1	1	3	2		
1+3					1	
1+1+2		1	1			
1+2+4					1	
1+2+4+5					1	
2	1	10	13	4	1	
2+2				1		
2+3			4	1	1	
2+4				3		
2+3+4				1		
3			19	2		1
3+4				2		
4			5	10	1	
5					1	1

5.3. Untersuchung der Blutproben auf Protease-resistentes Prion Protein

Die Blutproben wurden mit dem von FRANSCINI et al. (2006) entwickelten Test zum Nachweis von Protease-resistentem Prion Protein in den Monaten Juni und Juli 2006 im Labor der Alicon AG untersucht. Das Testprinzip beruht darauf, dass in einem ersten Schritt die Prion Proteine PrP^C und PrP^{res} an eine Matrix (Alicon PrioTrap[®]) gebunden werden, welche diese mit hoher Affinität und Spezifität erkennt. Die extrem hohe Bindungskapazität der Alicon

PrioTrap[®]-Matrix beruht auf hydrophoben und hydrophilen Oberflächenclustern, welche die verschiedenen Prion-Protein-Epitope erkennen und so eine quantitative Anreicherung extrem niedriger Prion Protein-Konzentrationen in Körperflüssigkeiten und Geweben ermöglichen. In einem zweiten Schritt wurde das PrP^{res} nach Behandlung der Probe mit Proteinase K wie mehrfach beschrieben (McKINLEY, 1983) im Westernblot nachgewiesen (Abb. 1). Ein positives Ergebnis war für das betreffende Tier nicht mit Konsequenzen verbunden, da sich der Test zum Zeitpunkt der Untersuchung in der Evaluationsphase befand und deshalb nicht offiziell anerkannt war.

Die Blutproben der Tiergruppe A wurden von einer Laborantin der Alicon AG, diejenigen der Tiergruppe B vom Doktoranden unter der Anleitung der Laborantin untersucht.

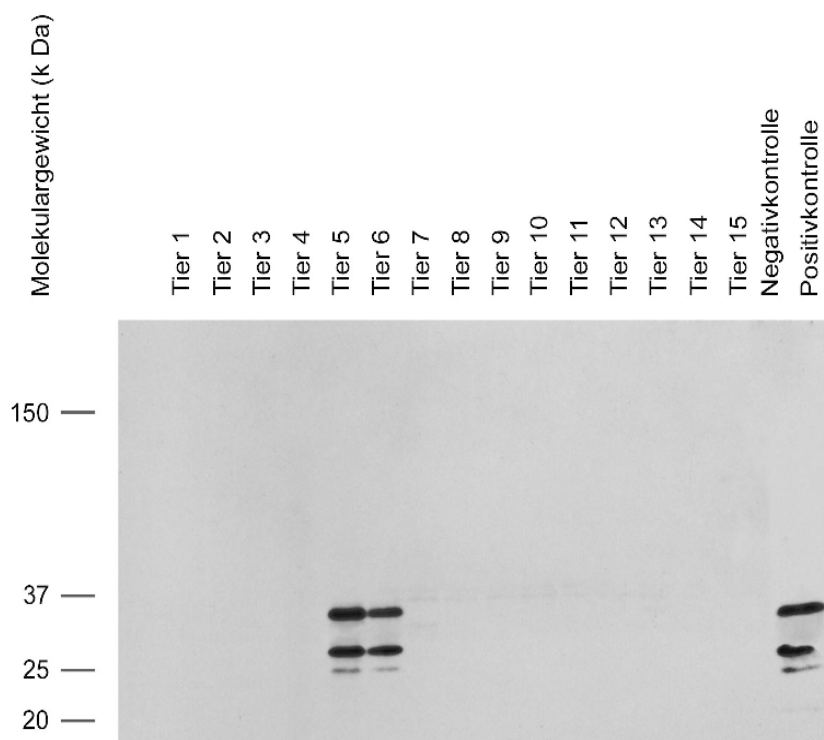


Abb. 1: Beispiel eines Westernblots. Die Tiere 5 und 6 zeigen das gleiche drei-bandige Muster sowie die gleiche Laufstrecke wie die Positivkontrolle. Bei den restlichen Tieren ist der PrP^{res}-Nachweis im Blut negativ.

5.4. Statistik

Die vom Bundesamt für Veterinärwesen zur Verfügung gestellten Daten und die Ergebnisse der Blutanalysen wurden mit Hilfe des Programms StatView 5.0 (SAS Institut, 8602 Wangen, Schweiz) statistisch erfasst und analysiert. Die kategorischen Daten wurden mittels Chi²-Test verglichen. Für den Vergleich der nicht parametrischen Verteilung der Jahresabstände zwischen dem Geburtsjahr der auf PrP^{res} positiv getesteten BSE-Nachkommen und dem BSE-Diagnosejahr beim Muttertier wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Dabei wurde die Nachkommengruppe als fixer Term eingesetzt. Grundsätzlich wurde ein P-Wert von ≤ 0.05 als signifikant angesehen.

5.5. Zusammenarbeit mit anderen Institutionen

Am Zustandekommen der vorliegenden Arbeit waren die folgenden Institutionen beteiligt:

- Alicon AG (Dr. R. Zahn): Untersuchung der Blutproben der BSE-Nachkommen auf Protease-resistentes Prion Protein und Anleitung des Doktoranden bei der Untersuchung der Blutproben der Gruppe B
- Abteilung für Bestandesmedizin der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich (PD Dr. M. Hässig): Hilfe bei der statistischen Auswertung der Resultate
- Bundesamt für Veterinärwesen (Frau Dr. D. Heim): Hilfe beim Zusammenstellen der benötigten Daten über die BSE-Muttertiere und bei der Aufklärung der Verwandtschaftsverhältnisse unter den BSE-Nachkommen
- Praxis Dres. P. Tschuor und V. Gartmann: Ermöglichung der Blutprobenentnahme im Praxisgebiet Ilanz und Umgebung.

6. ERGEBNISSE

6.1. BSE-Nachkommen (Tiergruppe A)

6.1.1. An BSE erkrankte Muttertiere der BSE-Nachkommen

Von den an BSE erkrankten Müttern der BSE-Nachkommen liegen keine Blutuntersuchungen auf Protease-resistentes Prion Protein vor, da von diesen Tieren damals kein Blut aufbewahrt wurde.

6.1.2. BSE-Nachkommen

Bei 29 (16.1 %) von 181 untersuchten BSE-Nachkommen wurde im Blutplasma PrP^{res} detektiert, 152 Tiere waren negativ. Unter den 29 Tieren bestanden keine Geschwisterverhältnisse.

6.1.2.1. Beziehung zwischen klinischen Parametern und einem positiven Testresultat

Von allen BSE-Nachkommen wurden bei der klinischen Untersuchung am Tierspital verschiedene Parameter festgehalten (BRAUN et al., 1998). Diese Parameter wurden einem positiven Nachweis von Protease-resistentem Prion Protein gegenübergestellt (Tab. 5). Keiner dieser Parameter konnte signifikant mit einem Nachweis vom PrP^{res} im Blut in Verbindung gebracht werden ($P > 0.05$).

Tab. 5: Beziehung zwischen klinischen Parametern und dem Nachweis von PrP^{res} im Blut

Klinische Parameter der BSE-Nachkommen	Einfluss auf PrP ^{res} - Nachweis (Signifikanz P)
Geburtsdatum	0.46
Geschlecht	0.97
Rasse	0.56
Anzahl Geschwister	0.21
Alter des Muttertiers (zum Zeitpunkt der Diagnose BSE)	0.11
Allgemeinzustand	0.23
Nährzustand	0.98
Appetit	0.98
Temperatur	0.55
Herzfrequenz	0.31
Atemfrequenz	0.45
Pansenmotorik	0.73

6.1.2.2. Zeitdifferenz von der Geburt der BSE-Nachkommen zum Diagnose-datum BSE beim Muttertier

Von negativen getesteten Nachkommen kamen 29 Tiere ein Jahr, 67 Tiere zwei Jahre, 40 Tiere drei Jahre, 10 Tiere vier Jahre, 5 Tiere fünf Jahre und ein Tier neun Jahre vor der BSE-Diagnose beim Muttertier zur Welt. Von den positiv getesteten Nachkommen wurden 12 Tiere ein Jahr, 12 Tiere zwei Jahre, 1 Tier drei Jahre, 3 Tiere vier Jahre und ein Tier fünf Jahre vor der BSE-Diagnose beim Muttertier geboren (Tab. 6).

Tab. 6: Häufigkeitsverteilung der zeitlichen Abstände von der Geburt der BSE-Nachkommen bis zur Erkrankung der Muttertiere an BSE bei Tieren mit positivem und negativem Bluttest

Zeitdifferenz in Jahren	Anzahl positiv getestete Tiere (%)	Anzahl negativ getestete Tiere (%)	Signifikanz (P)
1	12 (41.4 %)	29 (19.0 %)	$P < 0.05$
2	12 (41.4 %)	67 (44.1 %)	$P > 0.05$
3	1 (3.4 %)	40 (26.3 %)	$P > 0.05$
4	3 (10.4 %)	10 (6.6 %)	$P > 0.05$
5	1 (3.4 %)	5 (3.3 %)	$P > 0.05$
9	0 (0 %)	1 (0.7 %)	$P > 0.05$

Beim Vergleich der beiden prozentualen Häufigkeitsverteilungen zeigte sich, dass die Wahrscheinlichkeit für ein positives Blutergebnis bei einer Zeitdifferenz von einem Jahr signifikant grösser war als bei einer längeren Zeitdifferenz ($P < 0.05$, Mann-Whitney-U-Test, Abb. 2).

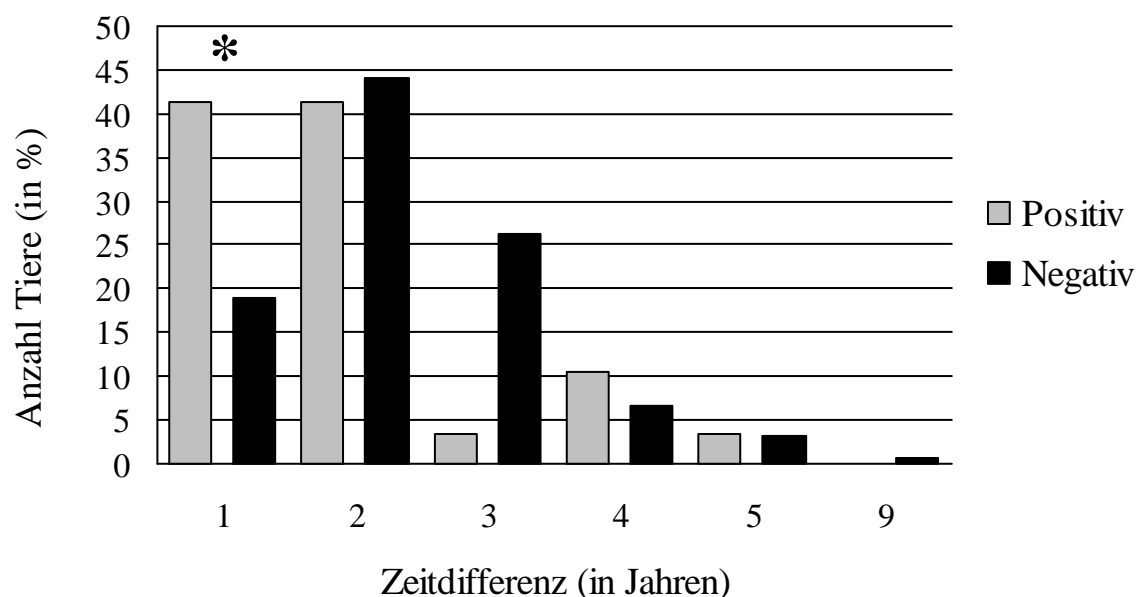


Abb. 2: Häufigkeitsverteilung der zeitlichen Abstände von der Geburt der BSE-Nachkommen bis zur Erkrankung der Muttertiere an BSE bei Tieren mit positivem und negativem Bluttest (* Differenz $P < 0.05$)

6.1.2.3. Rassenverteilung der BSE-Nachkommen mit PrP^{res} im Blut

In Bezug auf die Rassenverteilung der 29 positiv getesteten Tiere bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Rassen. 14 Tiere gehörten der Fleckvieh-, 12 der Braunvieh- und drei der Holstein-Friesian-Rasse an.

6.2. Vergleichsgruppe (Tiergruppe B)

In der gesunden Vergleichsgruppe wurden im Blut 10 Tiere positiv auf PrP^{res} getestet; 4 davon waren Muttertiere und 6 waren Nachkommen der Muttertiere. Die Muttertiere waren 6 (n = 3) und 7 Jahre (n = 1) alt. Die Nachkommen der Muttertiere waren 1 Jahr (n = 1), 2 Jahre (n = 1), 3 Jahre (n = 2) und 4 Jahre (n = 2) alt. In 3 Fällen waren Mutter und Nachkomme positiv (Tab. 6). Unter den 6 positiven Nachkommen lagen keine Geschwisterverhältnisse vor.

Tab. 6: Mutter-Nachkommenpaarungen mit positivem Nachweis von PrP^{res} im Blut

Muttertier positiv	Nachkomme positiv
Kuh, 6 Jahre	Rind, 2 Jahre
Kuh, 6 Jahre	Kuh, 3 Jahre
Kuh, 7 Jahre	Kuh, 4 Jahre

6.2.1. Zeitdifferenz zwischen der Geburt des Nachkommens und dem Testdatum beim Muttertier

Die kleine Zahl von nur 3 gleichzeitig positiven Muttertier-Nachkommen-Paaren lässt keine statistische Analyse in Bezug auf die Zeitdifferenz zwischen der Geburt des Nachkommens und dem Testdatum beim Muttertier zu.

6.3. Vergleich der positiven Blutbefunde der beiden Nachkommengruppen A und B

Bei den Tieren der Gruppe A (BSE-Nachkommen) waren mit 16.1 % signifikant mehr Blutproben positiv auf Protease-resistentes Prion Protein getestet worden als bei den Tieren der Kontrollgruppe B mit 4.5 % (Differenz $P < 0.01$, Chi²-Test, Tab. 7).

Tab. 7: Verteilung der positiven Tiere beider Tiergruppen

Gruppe	PrP ^{res} im Blut positiv	PrP ^{res} im Blut negativ
A (BSE-Nachkommen)	29 (16.1 %)	152 (83.9 %)
B (Vergleichstiere)	6 (4.5 %)	128 (95.5 %)

7. DISKUSSION

7.1. Vergleichbarkeit der Tiergruppen A und B

Um die Tiergruppe A mit der Tiergruppe B vergleichen zu können, war es nötig, das *Prionics*[®]-*Check WESTERN*-Resultat (Prionics-Test) der Muttertiere der Tiergruppe B anhand der Testresultate des BSE-Überwachungsprogramms aus dem Jahr 2006 abzuschätzen. Bei den klinisch gesunden Muttertieren waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme im Jahr 2006 keine Anzeichen von BSE festgestellt worden. Wären diese Tiere zum Zeitpunkt der Blutentnahme geschlachtet worden, wären sie im Rahmen des BSE-Überwachungsprogrammes als Normalschlachtung klassifiziert worden. Unter den im Jahre 2006 an 4627 Normalschlachtungen durchgeführten Prionics-Tests fiel das Resultat bei keinem Tier positiv aus. Es konnte deshalb davon ausgegangen werden, dass auch unter den 107 Muttertieren der Tiergruppe B kein Tier positiv getestet worden wäre und dass die Nachkommentiere von im Prionics-Test negativen Kühen stammten. Somit war eine Vergleichbarkeit zwischen den Tiergruppen A und B gegeben.

7.2. Maternale Übertragung

7.2.1. Vergleich der Resultate mit der MAFF-Studie

Bei 16.1 % der schweizerischen BSE-Nachkommen wurde im Blut PrP^{res} nachgewiesen. Diese Tiere zeigten bis zu ihrem Tod keine Anzeichen von BSE, und auch der Prionics-Test fiel bei allen Tieren negativ aus. Dieser relativ hohe Prozentsatz an positiven Tieren überrascht. Er liegt jedoch im Rahmen des Ergebnisses der Kohortenstudie (MAFF-Studie, 4.2.5.) aus Grossbritannien, in welcher von den 301 BSE-Nachkommen 42 Tiere (14 %) die für BSE charakteristischen histologischen Befunde zeigten (SEAC, 1997). Auch bei den Kontrolltieren der britischen Studie und der vorliegenden Untersuchung waren

die Ergebnisse ähnlich. So wurde histologisch bei 13 der 301 britischen Kontrolltiere (4.3 %) BSE nachgewiesen, während der PrP^{res}-Test in der vorliegenden Untersuchung bei 6 von 134 Tieren (4.5 %) positiv war. Das Risiko für einen BSE-Nachkommen, selbst an BSE zu erkranken, liegt laut der vorliegenden Studie im Vergleich zu einem Nicht-BSE-Nachkommen bei 11.6 %. Aufgrund dieses doch deutlichen Unterschieds kann nicht ausgeschlossen werden, dass es bei einem kleinen Prozentsatz der Fälle zu einer maternalen Übertragung gekommen ist.

7.2.2. Zeitabstand von der Geburt der PrP^{res}-positiven Nachkommen zum Diagnosedatum beim Muttertier

Von den BSE-Nachkommen mit einem einjährigen Zeitabstand zwischen ihrer Geburt und dem Einsetzen der klinischen Symptome beim Muttertier wurden signifikant mehr Tiere im Blut positiv auf PrP^{res} getestet als von den Tieren mit längerem Zeitabstand. Ein Vergleich mit der Kontrollgruppe war mangels genügender Daten (nur drei positive Paarungen) nicht möglich. Die Befunde der BSE-Nachkommen decken sich mit den Befunden der MAFF-Studie (DONNELLY et al., 1997), in welcher die Signifikanz für den gleichen Zeitabstand ähnlich deutlich war ($P = 0.03$). In der eigenen Untersuchung waren für einen Zeitabstand von über einem Jahr nicht signifikant mehr Tiere positiv getestet worden, was ebenfalls mit den Ergebnissen der MAFF-Studie übereinstimmt.

Es scheint möglich, dass PrP^{Sc} gegen Ende der Inkubationszeit ausser im Nervengewebe auch vermehrt im Blut vorkommt und über den Blutweg den Foetus transplazentar infiziert (AGUZZI, 2006). Dies würde das vermehrte Vorkommen von BSE bei BSE-Nachkommen erklären, welche gegen Ende der Inkubationszeit beim Muttertier geboren worden sind.

7.2.3. Transplazentare Übertragung

Das Molekulargewicht des BSE-Erregers beträgt zwischen 33 und 35 kD (PRUSINER, 1998). Vom Rind ist bekannt, dass die Plazenta für Proteine in dieser Grössenordnung prinzipiell eine Schranke darstellt (KNOBIL und NEILL, 2005). Eine Diffusion des PrP^{Sc} vom mütterlichen Blut in den Foetus scheint deswegen eher unwahrscheinlich. In der bovinen Plazenta kommen aber noch andere Transportmechanismen, wie zum Beispiel die Endozytose, vor (KNOBIL und NEILL, 2005). Gerade per Endozytose wäre eine Aufnahme des BSE-Erregers alleine vom Molekulargewicht her möglich, da in der bovinen Plazenta auch ganze maternale Erythrozyten (200 kD) endozytiert werden, um die Eisenversorgung des wachsenden Foeten zu sichern (RED-HORSE et al., 2004). Eine weitere Möglichkeit der transplazentaren Übertragung wäre über die durch mechanische Schädigung und degenerative Prozesse hervorgerufenen Unterbrüche in der normalerweise kontinuierlichen, durch das Synzytiotrophoblast gebildete Barriere. Diese Unterbrüche wurden bei verschiedenen Spezies, unter anderem auch beim Rind, beschrieben. Die Unterbrüche werden mit Fibrin (sogenanntem perivillärem Fibrin) gefüllt. Dieses Fibrin verfügt nicht über die gleiche Geschlossenheit wie der Synzytiotrophoblast, was zur Folge hat, dass Makromoleküle bis zu einer Grösse von 40 kD passieren können (KNOBIL und NEILL, 2005).

Die naheliegende, vergleichende Betrachtung von Darmschranke und Plazentarschranke ist nicht möglich, da bis heute unbekannt ist, wie PrP^{Sc} die Darmschranke im Muttertier überwindet.

7.2.4. Laktogene Übertragung

Bis heute wurde im Kolostrum und in der Milch von BSE-Kühen noch nie PrP^{Sc} nachgewiesen (EVEREST et al., 2006). Vor kurzem wurde jedoch in der Milch von gesunden Kühen normales Prion Protein detektiert (FRANSCINI et al., 2006). Deshalb scheint es prinzipiell möglich, dass auch PrP^{Sc} in der Milch von

BSE-Kühen ausgeschieden wird. In einer britischen Studie konnte jedoch bei keinem von 234 BSE-Nachkommen aus Mutterkuhhaltung BSE diagnostiziert werden (WILESMITH und RYAN, 1997). Bei diesen Tieren wurde sichergestellt, dass sie mindestens einen Monat lang Milch von ihrem an BSE erkrankten Muttertier getrunken hatten. Aufgrund dieser Ergebnisse ist es fraglich, ob die Milch von BSE-Kühen eine Infektionsquelle für ihre Nachkommen darstellt.

7.3. Der Bluttest der Alicon AG

Die Alicon AG hat einen Test entwickelt, mit dem Protease-resistentes Prion Protein im Blut von Rindern und Schafen nachgewiesen werden kann. Es darf davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesem Protein um PrP^{Sc} handelt, da bisher kein anderes Protease-resistentes Prion Protein im Blut von Rindern nachgewiesen wurde. Zudem zeigt das anhand der Alicon PrioTrap[®]-Matrix nachgewiesene Protein das gleiche elektrophoretische Auftrennungsbild wie PrP^{Sc}. Der Beweis jedoch, dass es sich bei diesem Protein um infektiöses PrP^{Sc} handelt, kann nur durch experimentelle Infektionen belegt werden, welche noch nicht durchgeführt wurden (ZAHN, 2006). Bis heute wurde noch nie offiziell bewiesen, dass PrP^{Sc} im Blut von an BSE erkrankten Rindern überhaupt vorkommt (CERVIA et al., 2006). Bekannt ist jedoch, dass infektiöses Prion-Protein (PrP^{Sc}) im Blut und im Speichel von an Chronic Wasting Disease erkrankten Hirschen (MATHIASON et al., 2006) und auch im Blut von Schafen mit klinischen Anzeichen von Scrapie (AGUZZI und GLATZEL, 2006) gefunden wurde. Es ist deshalb nicht unvorstellbar, dass PrP^{Sc} auch im Blut von klinischen und präklinischen BSE-Tieren vorkommt.

Die Testmethode der Alicon AG war zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Dissertation in der Evaluationsphase durch die öffentlichen Behörden (EFSA, 2004) und auch zur Patentierung angemeldet. Es sind noch keine offiziellen Angaben über die Sensitivität und Spezifität vorhanden. Trotzdem muss den Ergebnissen dieser Untersuchung Beachtung geschenkt werden, da die prozen-

tuale Verteilung der auf PrP^{res} positiv und negativ getesteten Tiere unter den schweizerischen BSE-Nachkommen mit den Ergebnissen der MAFF-Studie aus Grossbritannien stark korreliert.

7.3.1. Vergleich der Prionics-Resultate und der klinischen Befunde der auf PrP^{res} positiv getesteten BSE-Nachkommen

Bei 29 BSE-Nachkommen war der Bluttest auf PrP^{res} positiv, obschon alle anderen Untersuchungen auf BSE negativ waren (BRAUN et al., 1998; FATZER et al., 1998). Alle im Blut positiv getesteten Tiere waren weniger als 60 Monate alt. Das heisst, sie wurden zu einem Zeitpunkt getötet, zu dem BSE in der Schweiz erst bei knapp der Hälfte der erkrankten Tiere klinisch manifest geworden war (HAURI, 2004). Die mittlere Inkubationszeit für BSE beträgt nämlich 70.6 Monate mit einer Variation von 42 bis 108 Monaten (HAURI, 2004). Es wird deshalb vermutet, dass sich die positiven Tiere noch im Inkubationsstadium befanden und irgendwann später erkrankt wären.

7.3.2. Tiere der Gruppe B mit einem positiven Nachweis von PrP^{res}

Die für diese Studie beigezogene und zufällig ausgewählte Vergleichsgruppe setzte sich aus klinisch gesunden Tieren zusammen. Insbesondere wiesen sie zum Zeitpunkt der Blutentnahme im Jahre 2006 keine Anzeichen von BSE auf und stammten auch nicht von einem BSE-Muttertier ab. Bei insgesamt 10 dieser Tiere (4.2 %) konnte im Blut überraschenderweise PrP^{res} nachgewiesen werden. Diese positiv getesteten Tiere waren im Durchschnitt 50 ± 22 Monate alt. Sie sind im ältesten Falle 2 Jahre nach dem im Jahre 2000 verhängten absoluten Feed ban geboren worden. Ab diesem Datum war das Verfüttern von tierischen Eiweissen an alle Nutztiere verboten. Wie diese positiv getesteten Tiere mit dem infektiösen Agens in Kontakt gekommen waren, ist unklar. Eine perorale Infektion scheint jedoch unwahrscheinlich. Andere Infektionswege als der perorale Weg wurden beim Rind bis heute nicht gefunden.

Es erhebt sich die Frage, ob sich bei den von uns positiv getesteten Tieren im Lauf des Lebens einmal Anzeichen von BSE manifestieren würden. Vergleicht man die Prävalenz von PrP^{res} in dieser zufällig ausgewählten Gruppe (4.2 %) damit, dass in der Schweiz im Jahre 2006 nur bei einer Kuh (von in der Schweiz 567'342 vorkommenden Kühen) BSE mit vorgängigen klinischen Anzeichen gefunden wurde, so spricht dies nicht dafür. Auch der Prozentsatz der im Rahmen des schweizerischen BSE-Überwachungsprogrammes im Jahre 2006 erfassten Tiere mit BSE ist deutlich tiefer. In diesem Programm wurden nur bei 0.02 % von 20'566 untersuchten Tieren BSE gefunden.

7.4. Genetisch bedingte Empfänglichkeit für BSE

7.4.1. Genetische Prädisposition

In der statistischen Wahrscheinlichkeitsanalyse der Resultate der MAFF-Studie (4.2.5.1) wurde festgehalten, dass sowohl eine rein genetische Prädisposition als auch eine rein maternale Übertragung die erhöhte Inzidenz von BSE bei BSE-Nachkommen erklären können. Eine Kombination beider Parameter ist jedoch am wahrscheinlichsten für eine BSE-Erkrankung bei einem BSE-Nachkommen (FERGUSON et al., 1997). Es wurden jedoch weder die BSE-Nachkommen noch die BSE-Muttertiere der MAFF-Studie genetisch untersucht, um diese Vermutungen zu bestätigen.

SANDER (2004) konnte rassenunabhängig aufzeigen, dass ein Polymorphismus in der Region des Promotors für das PrP-Gen mit einer erhöhten Empfänglichkeit für BSE einhergeht. Ähnliche Polymorphismen, welche für die erhöhte Empfänglichkeit für Scrapie verantwortlich sind, wurden auch beim Schaf nachgewiesen (ANDREOLETTI et al., 2002).

Von den Tieren der vorliegenden Untersuchung wurde keine genetische Charakterisierung vorgenommen. Aus diesem Grund kann eine eventuelle genetische Prädisposition innerhalb dieser Tiergruppe nicht belegt werden.

7.4.2. Rassenbedingte Prädisposition

CLAUSS (2006) zeigte auf, dass sich unter den bayrischen BSE-Fällen überproportional viele Tiere der Braunviehrasse befanden. 27 % der erkrankten Tiere gehörten zur Braunviehrasse, obwohl diese Rasse nur 9 % der empfänglichen Population ausmacht. SAUTER-LOUIS et al. (2006) vermuteten eine genomische Ursache und fanden beim Braunvieh vermehrt Octapeptid-Wiederholungen im Prion-Protein-Gen. Es wurde festgehalten, dass dieser Unterschied im Genom sowohl für eine verkürzte Inkubationszeit als auch für eine erhöhte Empfänglichkeit verantwortlich sein könnte. Diese Rassenprädisposition konnte anhand des durchgeführten Bluttests nicht nachvollzogen werden, da die Tiergruppe B nur aus Tieren der Rasse Braunvieh bestand. Unter den PrP^{res}-positiven Tieren in der BSE-Nachkommengruppe (Tiergruppe A) waren von der Rasse Braunvieh 17.1 % positiv. Proportional am meisten positive Tiere fanden sich jedoch bei den Holstein-Friesian-Tieren mit 25 % positiven Rindern.

7.5 Schlussbemerkung

Die Anzahl der BSE-Fälle ist weltweit, so auch in der Schweiz, rückläufig. Vermutlich wird BSE in Zukunft jedoch weiterhin sporadisch auftreten, ohne dass in jedem Fall eine perorale Infektion mit dem Erreger nachvollzogen werden kann. Obwohl aufgrund der vorliegenden Untersuchung eine maternale Übertragung der Erkrankung bei einem kleinen Prozentsatz der Tiere vermutet werden kann, wird dieser Übertragungsweg auch in Zukunft von untergeordneter Bedeutung sein. Gerade in der Schweiz, aber auch in Grossbritannien und anderen europäischen Ländern, wurden die BSE-Nachkommen identifiziert, getötet und vernichtet. Dadurch wurde diese potentielle Infektionskette unterbrochen. Für Länder, in welchen noch BSE-Nachkommen vorkommen, kann die vorliegende Studie jedoch eine wissenschaftliche Grundlage beim Treffen der Massnahmen rund um die BSE-Nachkommen darstellen.

Das Testverfahren der schweizerischen Alicon AG erscheint vielversprechend. Dies wird auch gestützt durch die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung, welche sehr gut mit den Ergebnissen einer analogen britischen Studie (MAFF-Studie) korrelieren. Falls dieses Testverfahren die letzten Evaluationsstufen der internationalen Behörden erfolgreich absolviert und der Bluttest offiziell anerkannt wird, würde sich der Alicon AG ein grosser Markt eröffnen. Ein Testverfahren, mit welchem Rinder lebend auf BSE untersucht werden können, würde vor allem die Landwirtschaft jener Kontinente und Länder schützen, welche bis heute noch BSE-frei sind. Dies wären vor allem Asien, Australien und Südamerika. Grundsätzlich könnte mit einem flächendeckenden Einsatz des Tests und einem transparenten Umgang mit den positiv getesteten Tieren das Vertrauen der Konsumenten in die öffentlichen Ämter und in die Landwirtschaft weiter gestärkt werden.

8. LITERATURVERZEICHNIS

AGUZZI, A. (2002): Die Prionen-Hypothese und die Prionenerkrankungen des Menschen. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 115, 91-98.

AGUZZI, A. and M. GLATZEL (2006): Prion infections, blood and transfusions. Nat. Clin. Pract. Neurol. 6, 321-329.

ALDHOUS, P. (1990): Maternal transmission in antelope. Nature 348, 666.

ALDHOUS, P. (1991): BSE: First maternal transmission? Nature 350, 368.

ANDREOLETTI, O., C. LACROUX, A. CHABERT, L. MONNEREAU, G. TABOURET, F. LANTIER, P. BERTHON, F. EYCHENNE, S. LAFOND-BENESTAD, J. M. ELSEN and F. SCHELCHER (2002): PrP(Sc) accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. J. Gen. Virol. 83, 2607-2616.

ANONYM (2005): Überblick TSE-Formen. www.bvet.admin.ch/tiergesundheit/laborliste/index.html?ltyp=1&ts=B115&spr=1.

BRADLEY, R., J. G. COLLEE and P. P. LIBERSKI (2006): Variant CJD (vCJD) and bovine spongiform encephalopathy (BSE): 10 and 20 years on: part 1. Folia Neuropathol. 44, 93-101.

BRAUN, U., U. KIHLM, N. PUSTERLA und M. SCHÖNMANN (1997): Klinischer Untersuchungsgang bei Verdacht auf bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE). Schweiz. Arch. Tierheilk. 139, 35-41.

BRAUN, U., E. AMREIN, U. ESTERMANN, J. EGLI, T. SCHWEIZER, H. LUTZ, F. EHRENSPERGER, M. VANDEVELDE und U. KIHLM (1998): Untersuchungen an 182 Nachkommen von an boviner spongiformer Enzephalopathie (BSE) erkrankten Kühen in der Schweiz. Teil 1: Klinische Befunde. Schweiz. Arch. Tierheilk. 140, 240-249.

BRUGÈRE-PICOUX, J., K. ADJOU et H. BRUGÈRE (2005): Mise à jour des encéphalopathies spongiformes transmissibles subaigues (ESTA). Bull. Acad. Natl. Med. 189, 389-398.

BVET (2006a): Epidemiologie von Scrapie. Bundesamt für Veterinärwesen (BVET). www.bvet.admin.ch/tiergesundheit/00199/00203/00518/index.html?lang=de.

CERVIA, J. S., S. O. SOWEMIMO-COKER, G. A. ORTOLANO, K. WILKINS, J. SCHAFFER and S. T. WORTHAM (2006): An overview of prion biology and the role of blood filtration in reducing the risk of transfusion-transmitted variant Creutzfeldt-Jakob disease. Transfus. Med. Rev. 20, 190-206.

CLAUSS, M., C. SAUTER-LOUIS, E. CHAHER, C. POTTGIESSER, S. GOEBEL, T. SELHORST, H.-E. WICHMANN, W. KLEE and E. KIENZLE (2006): Investigations of the potential risk factors associated with cases of bovine spongiform encephalopathy in Bavaria, Germany. Vet. Rec. 158, 509-513.

COLLEE, J. G., R. BRADLEY and P. P. LIBERSKI (2006): Variant CJD (vCJD) and bovine spongiform encephalopathy (BSE): 10 and 20 years on: part 2. Folia Neuropathol. 44, 102-110.

CURNOW, R. N. and C. M. HAU (1996): The incidence of bovine spongiform encephalopathy in the progeny of affected sires and dams. Vet. Rec. 138, 407-408.

DEALLER, S. (2005): Tests that would be expected to show PrPsc in blood or plasma. www.priondata.org.

DONNELLY, C. A., A. C. GHANI, N. M. FERGUSON, J. W. WILESMITH and R. M. ANDERSON (1997): Analysis of the bovine spongiform encephalopathy maternal cohort study: evidence for direct maternal transmission. *Appl. Statist.* 46, 321-344.

EFSA (2004): Scientific report of the European Food Safety Authority on the design of a field trial protocol for the evaluation of BSE tests for live cattle. www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/tse_assessments/bse_tse/report_ej95_animal.Par.0001.File.dat/biohaz_sr_ej95_live_animal_bse_test_en.pdf.

EVEREST, S. J., L. T. THORNE, J. A. HAWTHORN, R. JENKINS, C. HAMMERSLEY, A. M. RAMSAY, S. A. HAWKINS, L. VENABLES, L. FLYNN, R. SAYERS, J. KILPATRICK, A. SACH, J. HOPE and R. JACKMAN (2006): No abnormal prion protein detected in the milk of cattle infected with the bovine spongiform encephalopathy agent. *J. Gen. Virol.* 87, 2433-2441.

FATZER, R., F. EHRENSPERGER, D. HEIM, J. SCHMIDT, A. SCHMITT, U. BRAUN und M. VANDEVELDE (1998): Untersuchungen an 182 Nachkommen von an boviner spongiformer Enzephalopathie (BSE) erkrankten Kühen in der Schweiz. Teil 2: Epidemiologische und pathologische Befunde. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 140, 250-254.

FERGUSON, N. M., C. A. DONNELLY, M. E. J. WOOLHOUSE and R. M. ANDERSON (1997): A genetic interpretation of heightened risk of BSE in offspring of affected dams. *Proc. R. Soc. Lond. B* 264, 1445-1455.

FRANSCINI, N., A. E. GEDAILY, U. MATTHEY, S. FRANITZA, M. S. SY, A. BÜRKLE, M. GROSCHUP, U. BRAUN and R. ZAHN (2006): Prion protein in milk. PLoS ONE 1, e71.

GLATZEL, M., J. GOTTWEIN und A. AGUZZI (2002): Prionen als die treibende Kraft bei transmissiblen spongiformen Enzephalopathien. Schweiz. Arch. Tierheilk. 144, 633-638.

HAURI, S. (2004): Untersuchungen bei 53 Kühen mit Boviner Spongiformer Enzephalopathie (BSE). Dissertation, Universität Zürich.

HEIM, D. and U. KIHLM (2003): Risk management of transmissible spongiform encephalopathies in Europe. Rev. Sci. Tech. 22, 179-199.

HUNTER, N., W. GOLDMANN, G. SMITH and J. HOPE (1994): Frequencies of PrP gene variants in healthy cattle and cattle with BSE in Scotland. Vet. Rec. 135, 400-403.

KNOBIL, E. and J. D. NEILL (2005): Anatomy and genesis of the placenta. In: Physiology of Reproduction, J. D. Neill. Raven Press, New York, 461.

KOBAYASHI, A., S. SATOH, J. W. IRONSIDE, S. MOHRI and T. KITAMOTO (2005): Type 1 and type 2 human PrPSc have different aggregation sizes in methionine homozygotes with sporadic, iatrogenic and variant Creutzfeldt-Jakob disease. J. Gen. Virol. 86, 237-240.

KÜBLER, E., B. OESCH and A. J. RAEGER (2003): Diagnosis of prion diseases. Br. Med. Bull. 66, 267-279.

MATHIASON, C. K., J. G. POWERS, S. J. DAHMES, D. A. OSBORN, K. V. MILLER, R. J. WARREN, G. L. MASON, S. A. HAYS, J. HAYES-

KLUG, D. M. SEELIG, M. A. WILD, L. L. WOLFE, T. R. SPRAKER, M. W. MILLER, C. J. SIGURDSON, G. C. TELLING and E. A. HOOVER (2006): Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease. *Science* 314, 133-136.

McKINLEY, M. P., D. C. BOLTON and S. B. PRUSINER (1983): A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* 35, 57-62.

O.I.E. (2006): Epidemiology of BSE. World Organisation for Animal Health. www.oie.int/eng/info/en_esbcarte.htm.

PRUSINER, S. B. (1982): Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216, 136-144.

PRUSINER, S. B. (1998): The prion diseases. *Brain. Pathol.* 8, 499-513.

RÄBER, A. J. and B. OESCH (2006): Diagnostics for TSE agents. *Dev. Biol.* 123, 313-323.

RED-HORSE K., Y. ZHOU and F. S. JANE. (2004): Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J. Clin. Invest.* 114, 744-754.

RIEK, R., S. HORNEMANN, G. WIDER, R. GLOCKSHUBER and K. WÜTH-RICH (1997): NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett.* 413, 282-288.

SANDER, P., H. HAMANN, I. PFEIFFER, W. WEMHEUER, B. BRENIG, M. H. GROSCHUP, U. ZIEGLER, O. DISTL and T. LEEB (2004): Analysis of sequence variability of the bovine prion protein gene (PRNP) in German cattle breeds. *Neurogenetics* 5, 19-25.

SAUTER-LOUIS, C., M. CLAUSS, E. CHAHER, W. KLEE, H.-E. WICHMANN and E. KIENZLE (2006): Breed predisposition for BSE: Epidemiological evidence in Bavarian cattle. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 148, 245-250.

SEAC (1996): Statement on maternal transmission of BSE. Spongiform Encephalopathy Advisory Committee. www.seac.gov.uk/statements/state29jul96.htm.

SEAC (1997): Statement on maternal transmission of BSE. Spongiform Encephalopathy Advisory Committee. www.seac.gov.uk/statements/state16apr97.htm.

SHAKED, G. M., Y. SHAKED, Z. KARIV-INBAL, M. HALIMI, I. AVRAHAM and R. GABIZON (2001): A protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases. *J. Biol. Chem.* 276, 1479-1482.

TAYLOR, D. M., C. E. FERGUSON, C. J. BOSTOCK and M. DAWSON (1995): Absence of disease in mice receiving milk from cows with bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.* 136, 592.

WATT, N. T. and N. M. HOOPER (2005): Reactive oxygen species (ROS)-mediated beta-cleavage of the prion protein in the mechanism of the cellular response to oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 1123-1125.

WILESMITH, J. W., G. A. WELLS, M. P. CRANWELL and J. B. RYAN (1988): Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet. Rec.* 123, 638-644.

WILESMITH, J. W. and J. B. RYAN (1992): Bovine spongiform encephalopathy: recent observations on the age-specific incidences. Vet. Rec. 130, 491-492.

WILESMITH, J. W. and J. B. M. RYAN (1997): Absence of BSE in the offspring of pedigree suckler cows affected by BSE in Great Britain. Vet. Rec. 141, 250-251.

WRATHALL, A. E., K. F. BROWN, A. R. SAYERS, G. A. WELLS, M. M. SIMMONS, S. S. FARRELLY, P. BELLERBY, J. SQUIRRELL, Y. I. SPENCER, M. WELLS, M. J. STACK, B. BASTIMAN, D. PULLAR, J. SCATCHERD, L. HEASMAN, J. PARKER, D. A. HANNAM, D. W. HELLIWELL, A. CHREE and H. FRASER (2002): Studies of embryo transfer from cattle clinically affected by bovine spongiform encephalopathy (BSE). Vet. Rec. 150, 365-378.

ZAHN, R. (2006): Mitteilung über den Zwischenstand der Evaluation des Testprinzips. Persönliche Mitteilung.

9. LEBENSLAUF

Name Andreas Christian Tschuor

Geburtsdatum 22. September 1978

Geburtsort Ilanz GR

Nationalität Schweiz

Heimatort Trun GR

1985 - 1992 Primarschule in Ilanz, GR

1992 – 1999 Gymnasium Klosterschule Disentis, GR

1999 Maturität Typus E

1999-2005 Studium der Veterinärmedizin an der Universität Zürich

2005 Staatsexamen in Veterinärmedizin an der Universität Zürich

Seit Okt. 2005 Assistent und Doktorand am Departement für Nutztiere der
Universität Zürich.

10. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen, die zur Entstehung der vorliegenden Arbeit beigetragen haben, herzlich danken:

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Ueli Braun für die Überlassung des Themas, die Übernahme des Referats und die stets gewährte freundliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. F. Ehrensperger für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Dr. R. Zahn für die Möglichkeit, die Blutuntersuchungen in seinem Labor durchführen zu dürfen.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Alicon AG, insbesondere Frau Dr. Susanne Franitza und Frau Esther Beerli für die grosse Unterstützung bei der Laborarbeit und die vielen interessanten und lehrreichen Gespräche.

Frau Dr. Dagmar Heim, Bundesamt für Veterinärwesen, für die Hilfe bei der Zusammenstellung der für diese Arbeit benötigten Daten der BSE-Nachkommen.

Herrn PD Dr. Michael Hässig für die unersetzbare Hilfe bei der statistischen Auswertung der Resultate.

Meinen Arbeitskolleginnen und -kollegen Frau Dr. Gabi Schweizer, Frau Dr. Diana Wehbrink, Frau med. vet. Ulla Gorber, Herrn Dr. Bernhard Feller und Herrn med. vet. Stephan Rauch für ihre Mehrarbeit während meinen Laborarbeiten und ihre kollegiale Unterstützung.

Der Praxis Dres. P. Tschuor und V. Gartmann dafür, dass die Kontrollgruppe in ihrem Kundenstamm gesucht werden durfte.

Den vielen Tierbesitzern, welche ihre Zeit aufgewendet haben und mir ihre Tiere für die Untersuchung zur Verfügung stellten.

Meinen Eltern Marianne und Paulin Tschuor, Debora und meinen Geschwistern Flurin, Christoph und Anna-Barbara für die ermunternde Unterstützung beim Erstellen der Dissertation.

